

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2000年 3月23日

出願番号

Application Number:

特願2000-082930

出願人

Applicant(s):

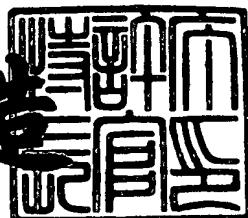
オリンパス光学工業株式会社
株式会社日本ローパー
科学技術振興事業団

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2001年 5月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3045677

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 NP99483-KT
【提出日】 平成12年 3月23日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 21/65
【発明の名称】 二重共鳴吸収顕微鏡
【請求項の数】 6
【発明者】
【住所又は居所】 東京都青梅市河辺町4-21-5-206
【氏名】 池滝 慶記
【発明者】
【住所又は居所】 愛知県岡崎市竜美南2-3-1 6号棟303号
【氏名】 藤井 正明
【発明者】
【住所又は居所】 愛知県岩倉市新柳町2-38
【氏名】 酒井 誠
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市戸塚区平戸5-10-9
【氏名】 尾松 孝茂
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県川崎市幸区塚越4-320-4-1209
【氏名】 佐藤 卓
【特許出願人】
【識別番号】 000000376
【氏名又は名称】 オリンパス光学工業株式会社
【特許出願人】
【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬1-3
【氏名又は名称】 株式会社日本ローパー

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 二重共鳴吸収顕微鏡

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料分子を基底状態から一重項状態の第一電子励起状態へ励起させる波長 λ_1 のポンプ光の光源と、第一電子励起状態の試料分子を一重項状態の第二電子励起状態またはより高い励起状態へ励起させる波長 λ_2 のプローブ光の光源と、ポンプ光およびプローブ光の照射領域を一部分もしくは全部分重ね合わせる重ね手段とを有しており、

重ね手段を介してポンプ光およびプローブ光を試料に照射し、試料のポンプ光およびプローブ光が重なり合った領域から発生する過渡ラマン散乱光を検出することを特徴とする二重共鳴吸収顕微鏡。

【請求項2】 試料分子を基底状態から一重項状態の第一電子励起状態へ励起させる波長 λ_1 のポンプ光の光源と、第一電子励起状態からそれよりも低エネルギーである三重項準位へ遷移した試料分子をその三重項準位よりも高い励起三重項準位へ励起させる波長 λ_3 のプローブ光の光源と、ポンプ光およびプローブ光の照射領域を一部分もしくは全部分重ね合わせる重ね手段とを有しており、

重ね手段を介してポンプ光およびプローブ光を試料に照射し、試料のポンプ光およびプローブ光が重なり合った領域から発生する過渡ラマン散乱光を検出することを特徴とする二重共鳴吸収顕微鏡。

【請求項3】 試料分子を基底状態から一重項状態の第一電子励起状態へ励起させる波長 λ_1 のポンプ光の光源と、第一電子励起状態の試料分子を一重項状態の第二電子励起状態またはより高い励起状態へ励起させる波長 λ_2 のプローブ光の光源と、第一電子励起状態からそれよりも低エネルギーである三重項準位へ遷移した試料分子をその三重項準位よりも高い励起三重項準位へ励起させる波長 λ_3 のプローブ光の光源と、ポンプ光およびプローブ光の照射領域を一部分もしくは全部分重ね合わせる重ね手段と、波長 λ_2 のプローブ光および波長 λ_3 のプローブ光の試料への照射時間を調整する照射時間調整手段とを有しており、

重ね手段を介してポンプ光およびプローブ光を試料に照射するとともに、照射時間調整手段の照射時間調整によって波長 λ_2 のプローブ光は試料分子が第一電

子励起状態から三重項準位へ遷移する前に照射され、また波長 λ_3 のプローブ光は試料分子が第一電子励起状態から三重項準位へ遷移した後に照射されて、試料のポンプ光およびプローブ光が重なり合った領域から発生する過渡ラマン散乱光を検出することを特徴とする二重共鳴吸収顕微鏡。

【請求項4】 照射時間調整手段が、プローブ光の光路調整によって試料への照射時間を調整する遅延光学系である請求項3の二重共鳴吸収顕微鏡。

【請求項5】 ポンプ光およびプローブ光の偏光状態または波長または強度を可変する手段が備えられている請求項1ないし4のいずれかの二重共鳴吸収顕微鏡。

【請求項6】 励起される試料分子がカチオンである請求項1ないし5のいずれかの二重共鳴吸収顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、二重共鳴吸収顕微鏡に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、二重共鳴吸収過程および過渡ラマン散乱過程の併用により、平面分解能とともに三次元分解能をも実現する、全く新しい二重共鳴吸収顕微鏡に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年、レーザー技術や電子画像技術をはじめとする周辺技術の進歩にともない、様々なタイプの高性能かつ多機能な顕微鏡が開発されてきている。本願発明の発明者も、その一つとして、複数波長の光を試料に照明することによって発生する二重共鳴吸収過程を用いて、得られる画像のコントラスト制御および試料の化学分析を可能とする顕微鏡（以下、二重共鳴吸収顕微鏡と呼ぶ）をすでに提案している（特願平6-329165参照）。

【0003】

この二重共鳴吸収顕微鏡では、二重共鳴吸収過程を用いて特定の分子を選択し、特定の光学遷移に起因する吸収および蛍光を観測することができる。その原理

を説明すると、まず、基底状態 (S_0 状態: 図 1) の試料分子 (つまり、試料を構成する分子) が持つ価電子軌道の電子を、レーザー光などの共鳴波長 λ_1 光により第一電子励起状態へ励起させ (S_1 状態: 図 2)、続いて共鳴波長 λ_2 光により第二電子励起状態またはさらに高位の励起状態へ励起させる (S_2 状態: 図 3)。分子は、この励起状態から蛍光あるいは燐光を発光したりして基底状態に戻る (図 4)。そして、図 2 に示した吸収や図 4 に示した蛍光や燐光の発光を用いて吸収像や発光像を観察する。

【0004】

S_1 状態への励起過程においては、単位体積内の S_1 状態の分子数は照射する光の強度が増加するにしたがって増加する。線吸収係数は、分子一個当たりの吸収断面積と単位体積当たりの分子数の積で与えられるので、 S_2 状態への励起過程においては続いて照射する共鳴波長 λ_2 に対する線吸収係数は最初に照射した共鳴波長 λ_1 の光の強度に依存する。すなわち、共鳴波長 λ_2 (以下、波長 λ_2 と略称) に対する線吸収係数は共鳴波長 λ_1 (以下、波長 λ_1 と略称) の光の強度で制御できる。このことは、波長 λ_1 および波長 λ_2 の 2 波長の光で試料を照射し、波長 λ_2 による透過像を撮影すれば、透過像のコントラストを波長 λ_1 の光で完全に制御できることを示している。また、 S_2 状態からの蛍光または燐光による脱励起過程が可能である場合には、その発光強度は S_1 状態にある分子数に比例する。したがって、蛍光顕微鏡として利用する場合にも画像コントラストの制御が可能となる。

【0005】

また、この二重共鳴吸収顕微鏡は、コントラストの制御のみならず、化学分析も可能にする。図 1 に示される最外殻価電子軌道は個々の分子に固有なエネルギー準位をもつので、波長 λ_1 は分子によって異なる。同時に波長 λ_2 も分子固有のものとなる。单一波長で照明・観察を行う従来の顕微鏡においても、ある程度は特定の分子の吸収像あるいは蛍光像を観察することが可能ではあるが、一般にはいくつかの分子の吸収帶の波長領域は重複するため、試料の化学組成の正確な同定までは不可能である。これに対し、二重共鳴吸収顕微鏡では波長 λ_1 および波長 λ_2 の 2 波長により吸収あるいは発光する分子を限定するので、従来技術より

も正確な試料の化学組成の同定が可能となる。また、価電子を励起する場合、分子軸に対して特定の電場ベクトルを持つ光のみが強く吸収されるので、波長 λ_1 および波長 λ_2 の偏光方向を決めて、吸収像または蛍光像を撮影すれば、同じ分子でも配向方向の同定をも行うことができる。

【0006】

本願発明の発明者はさらに、回折限界を越える高い空間分解能の二重共鳴吸収顕微鏡をも提案している（特願平8-302232参照）。二重共鳴吸収過程については、図5に例示したようにS₂状態からの蛍光が極めて弱くなるある種の分子が存在する。このような光学的性質を持つ分子に対しては、以下のような極めて興味深い現象が起きる。図6は、図5と同じく二重共鳴吸収過程の概念図であるが、横軸にX軸を設けて空間的距離の広がりを表現しており、波長 λ_1 光および波長 λ_2 光が照射されている空間領域A₁（＝蛍光抑制領域）と、波長 λ_1 光のみが照射されて波長 λ_2 光が照射されていない空間領域A₀（＝蛍光領域）について示している。空間領域A₀では波長 λ_1 光による励起によってS₁状態の分子が多数生成される。このとき空間領域A₀からは波長 λ_3 で発光する蛍光が見られる。しかし空間領域A₁では、波長 λ_2 光が照射されるので、S₁状態の分子が即座に高位のS₂状態へと励起され、S₁状態の分子は存在しなくなる。このため空間領域A₁においては、波長 λ_3 の蛍光は全く発生せず、しかもS₂状態からの蛍光はもともとないので、完全に蛍光自体が抑制されることとなる。すなわち蛍光が発生するのは空間領域A₀のみとなる。このような現象の発生が数種類の分子において確認されている。

【0007】

したがって、従来の走査型レーザー顕微鏡などでは、レーザー光を集光して観察試料上に形成されるマイクロビームのサイズが集光レンズの開口数と波長による回折限界で決まるので、それ以上の空間分解能が原理的に期待できないにの対し、図6で示した現象によれば波長 λ_1 光と波長 λ_2 光を空間的に一部分重ね合わせることで、波長 λ_2 光の照射で蛍光領域が抑制されるため、たとえば波長 λ_1 光の照射領域に着目すると、蛍光領域は集光レンズの開口数と波長とで決まるビームのサイズよりも狭くなっている、実質的に空間分解能の向上が図られている。

本願発明者による二重共鳴吸収顕微鏡（特願平8-302232参照）は、この原理を用いて、回折限界を越える超解像顕微鏡を実現しているのである。

【0008】

そして本願発明の発明者は、この二重共鳴吸収顕微鏡の超解像性をさらに高めるべく、その機能を十分に活かすための試料の調整や波長 λ_1 光・波長 λ_2 光の試料への照射タイミングなどをもすでに提案している（特願平9-255444参照）。より具体的には、試料を染色分子により染色する。この染色分子として、基底状態を含め少なくとも3つの量子状態（S₀状態、S₁状態、S₂状態・・・）を有し、且つS₁状態を除く高位の量子状態から基底状態へ脱励起するときの遷移において蛍光による緩和過程よりも熱緩和過程が支配的である各種分子（以下、蛍光ラベラー分子と呼ぶ）を用いるのである。このような蛍光ラベラー分子と生化学的な染色技術を施した生体分子とを化学結合させてなる試料に、波長 λ_1 光を照射して蛍光ラベラー分子をS₁状態に励起させ、続いて即座に波長 λ_2 光を照射して蛍光ラベラー分子をより高位の量子準位に励起させることで、S₁状態からの蛍光を効果的に抑制できるようになる。この際に、上述したような空間的な蛍光領域の人為的な抑制を行うことにより、空間分解能のさらなる向上が実現される。

【0009】

上記の蛍光ラベラー分子の光学的性質は、以下のように量子化学的な見地から説明できる。一般に、分子はそれを構成する各原子のσまたはπ結合によって結ばれている。言い換えると、分子の分子軌道はσ分子軌道またはπ分子軌道をもつていて、これらの分子軌道に存在する電子が各原子を結合する重要な役割を担っている。そのなかでも、σ分子軌道の電子は、各原子を強く結合し、分子の骨格である分子内の原子間距離を決める。これに対して、π分子軌道の電子は、各原子の結合にほとんど寄与しないで、むしろ分子全体に極めて弱い力で束縛される。

【0010】

多くの場合、σ分子軌道にいる電子を光で励起させると、分子の原子間隔が大きく変化し、分子の解離を含む大きな構造変化が起こる。その結果として、原子

の運動エネルギー や構造変化するために光が分子に与えたエネルギーのほとんどが熱エネルギーに形を変える。したがって、励起エネルギーは蛍光という光の形態で消費されない。また、分子の構造変化は極めて高速におこるので（たとえばピコ秒より短い）、その過程で仮に蛍光が起きても極めて蛍光寿命が短い。しかしそれに対して、 π 分子軌道の電子が励起しても、分子の構造自体はほとんど変化せず、高位の量子的な離散準位に長時間とどまり、ナノ秒のオーダーで蛍光を放出して脱励起する性質を持つ。

【0011】

量子化学よれば、分子が π 分子軌道を持つことと、二重結合を持つこととは同等であり、用いる蛍光ラベラー分子には、二重結合を豊富に持つ分子を選定することが必要条件となる。そして、二重結合を持つ分子でもベンゼンやビラジンなどの6員環分子においては、S₂状態からの蛍光が極めて弱いことが確かめられている（例えば、M..Fujii et.al., Chem. Phys. Lett. 171 (1990) 341）。したがって、ベンゼンやビラジンなどの6員環分子を含む分子を蛍光ラベラー分子として選定すればS₁状態からの蛍光寿命が長くなり、しかも光照射によりS₁状態からS₂状態に励起させることで分子からの蛍光を容易に抑制でき、上述の二重共鳴吸収顕微鏡の超解像性を効果的に利用することができるようになる。

【0012】

すなわち、これらの蛍光ラベラー分子により試料を染色して観察を行えば、高空間分解能の蛍光像を取得することができるだけでなく、その蛍光ラベラー分子の側鎖の化学基を調整することにより生体試料の特定の化学組織のみを選択的に染色でき、試料の詳細な化学組成までも分析可能となる。

【0013】

一般に、二重共鳴吸収過程は二つの光の波長や偏光状態等が特定の条件を満たす場合のみに起こるので、これを用いることで非常に詳細な分子の構造を知ることが可能となる。すなわち、光の偏光方向と分子の配向方向とは強い相関関係があり、二波長光それぞれの偏光方向と分子の配向方向とが特定の角度をなすとき二重共鳴吸収過程が強く起こる。したがって、二波長光を試料に照射して、各光の偏光方向を回転することにより、蛍光の消失の程度が変化するので、その様子

から観察しようとする組織の空間配向の情報も得られる。さらに、二つの波長の光を調整させることでもこのことが可能である。

【0014】

他方、波長 λ_1 光と波長 λ_2 光の照射タイミングを適当なものに調整することにより（特願平9-255444参照）、蛍光像のS/Nを改善し、且つ蛍光抑制をさらに効果的に起こすこととも可能となっている。

【0015】

また、本願発明の発明者により、波長 λ_1 光と波長 λ_2 光の照射タイミングのさらなる工夫により、S/Nおよび蛍光抑制のさらなる向上を実現することも提案されている（特願平10-97924参照）

【0016】

【発明が解決しようとする課題】

さて、以上のように本願発明の発明者によってこれまで開発されてきた二重共鳴吸収顕微鏡は、その超解像性と分析能力において際立った有用性と技術的優位性を示しているものの、未だに以下に示すような改良すべき点が残されているのが実情である。

【0017】

近年の顕微鏡の高性能化において、光軸方向の深さ分解能、つまり三次元空間分解能を実現することは大きな課題となっているが、他の従来の光学顕微鏡と同様、二重共鳴吸収顕微鏡も光軸方向の深さ分解能を持ち合わせていないのである。前述したように波長 λ_1 光と波長 λ_2 光の照射領域を一部分重ね合わせた場合における空間分解能の向上は、平面分解能のみについてのものである。波長 λ_2 光が重なっている波長 λ_1 光のビーム周縁領域では蛍光が抑制されるが、波長 λ_2 光の中空部の光軸上では全く蛍光が抑制されず、光軸上にある分子が発光する。すなわち、原理的には光軸方向の深さ分解能は無いことになる。深さ分解能を持たせるために、たとえば検出器の全面で且つ共焦点位置にピンホールを設置することも可能であるが、実用上、ピンホールを含む結像光学系のアライメントが複雑化したり、検出器に到達する蛍光の光子数が低下したりするという問題点がある。

【0018】

したがって、結像光学系等の構成が複雑化することなく、平面分解能とともに深さ分解能をも持ち合わせることは、従来には全くない、極めて高性能な顕微鏡を実現することになるのである。

【0019】

この出願の発明は、以上の通りの事情に鑑みてなされたものであり、従来の二重共鳴吸収顕微鏡を改良し、優れた三次元空間分解能を有する、全く新しい二重共鳴吸収顕微鏡を提供することを課題としている。

【0020】

【課題を解決するための手段】

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、試料分子を基底状態から一重項状態の第一電子励起状態へ励起させる波長 λ_1 のポンプ光の光源と、第一電子励起状態の試料分子を一重項状態の第二電子励起状態またはより高い励起状態へ励起させる波長 λ_2 のプローブ光の光源と、ポンプ光およびプローブ光の照射領域を一部分もしくは全部分重ね合わせる重ね手段とを有しており、重ね手段を介してポンプ光およびプローブ光を試料に照射し、試料のポンプ光およびプローブ光が重なり合った領域から発生する過渡ラマン散乱光を検出することを特徴とする二重共鳴吸収顕微鏡（請求項1）や、試料分子を基底状態から一重項状態の第一電子励起状態へ励起させる波長 λ_1 のポンプ光の光源と、第一電子励起状態からそれよりも低エネルギーである三重項準位へ遷移した試料分子をその三重項準位よりも高い励起三重項準位へ励起させる波長 λ_3 のプローブ光の光源と、ポンプ光およびプローブ光の照射領域を一部分もしくは全部分重ね合わせる重ね手段とを有しており、重ね手段を介してポンプ光およびプローブ光を試料に照射し、試料のポンプ光およびプローブ光が重なり合った領域から発生する過渡ラマン散乱光を検出することを特徴とする二重共鳴吸収顕微鏡（請求項2）や、試料分子を基底状態から一重項状態の第一電子励起状態へ励起させる波長 λ_1 のポンプ光の光源と、第一電子励起状態の試料分子を一重項状態の第二電子励起状態またはより高い励起状態へ励起させる波長 λ_2 のプローブ光の光源と、第一電子励起状態からそれよりも低エネルギーである三重項準位へ遷移した試料分子をそ

の三重項準位よりも高い励起三重項準位へ励起させる波長 λ_3 のプローブ光の光源と、ポンプ光およびプローブ光の照射領域を一部分もしくは全部分重ね合わせる重ね手段と、波長 λ_2 のプローブ光および波長 λ_3 のプローブ光それぞれの試料への照射時間を調整する照射時間調整手段とを有しており、重ね手段を介してポンプ光およびプローブ光を試料に照射するとともに、照射時間調整手段の照射時間調整によって波長 λ_2 のプローブ光は試料分子が第一電子励起状態から三重項準位へ遷移する前に照射され、波長 λ_3 のプローブ光は試料分子が第一電子励起状態から三重項準位へ遷移した後に照射されて、試料のポンプ光およびプローブ光が重なり合った領域から発生する過渡ラマン散乱光を検出することを特徴とする二重共鳴吸収顕微鏡（請求項3）を提供する。

【0021】

また、この出願の発明は、上記の二重共鳴吸収顕微鏡において、照射時間調整手段が、プローブ光の光路調整によって試料への照射時間を調整する遅延光学系であること（請求項4）や、ポンプ光およびプローブ光の偏光状態または波長または強度を可変する手段が備えられていること（請求項5）や、励起される試料分子がカチオンであること（請求項6）をその態様として提供する。

【0022】

【発明の実施の形態】

この出願の発明は上記のとおりの特徴を持つものであり、三次元空間分解能を発現させるべく、少なくともポンプ光光源とプローブ光光源と重ね手段とを備え、ポンプ光とプローブ光との二重共鳴吸収過程および過渡ラマン散乱過程を併用して、両光が重なり合った領域から発生する過渡ラマン散乱光を検出する二重共鳴吸収顕微鏡としている。

【0023】

この二重共鳴吸収顕微鏡が検出・観察対象としている過渡ラマン散乱光には、一重項状態の第二電子励起状態からの遷移における通常の過渡ラマン散乱光と、三重項準位を経由した励起三重項準位からの遷移における過渡ラマン散乱光とがある。ここでは説明の簡略化のため、前者を一重項過渡ラマン散乱光、後者を三重項過渡ラマン散乱光と呼ぶこととし、それぞれの場合について以下に説明する

。また、一重項過渡ラマン散乱光を検出する場合の波長 λ_2 のプローブ光は一重項用プローブ光、三重項過渡ラマン散乱光を検出する場合の波長 λ_3 のプローブ光は三重項用プローブ光と呼ぶこととする。

【0024】

[一重項過渡ラマン散乱光]

図7は、一重項過渡ラマン散乱光について説明する概念図である。この図7に例示したように、まず、波長 λ_1 (=光子エネルギー $E_1 - E_0$ に対応する波長) を有する光(以下、ポンプ光と呼ぶ)によって基底状態 S_0 (=エネルギー E_0) の試料分子を第一電子励起状態 S_1 (=エネルギー E_1)へ励起させ、続いて、 S_1 状態の寿命内に、波長 λ_2 (=光子エネルギー $E_2 - E_1$ に対応する波長。なお、第二電子励起状態より高位の電子励起状態への励起の場合にはそのエネルギー $-E_1$ に対応する波長) を有する一重項用プローブ光によって S_1 状態の試料分子を第二電子励起状態 S_2 (=エネルギー E_2)へ励起させる。ここで、電子励起状態 S_2 の中には、通常は存在しないが、強いレーザー電場が分子に加わったときのみに瞬間に存在するところのいわゆる仮想的量子状態も含まれる。通常、これら S_1 状態および S_2 状態はスピン多重度が1であり、分光学的には一重項状態に属する。この際、 S_2 状態と S_1 状態の高次振動準位 E_f とのエネルギー差を持った光子エネルギーの光子($E_2 - E_f =$ 波長 λ_4)が S_2 状態の試料分子より散乱される。このような過程で散乱される散乱光が過渡ラマン散乱光である。これは、一種の共鳴ラマン散乱過程と言うことができ、極めて高い散乱断面積をもつ。

【0025】

このような過渡ラマン散乱光を検出する場合、バックグラウンド信号となる S_2 状態から S_1 状態へ遷移する蛍光が発生する確率は極めて低く、注目する波長帯域で観測されるのは過渡的状態よりの共鳴ラマン光、つまり過渡ラマン散乱光のみである。しかも、ポンプ光で基底状態の試料分子を S_1 状態へ励起させた際、通常の試料分子では S_1 状態から強い蛍光が発光するが、これは過渡ラマン散乱光が観測される波長帯域よりも遙かに短波長領域なので、簡単なシャープカットフィルターで過渡ラマン散乱光のみを分離抽出できる。さらに、2波長光(ポンプ光および一重項用プローブ光)照射による二重共鳴吸収過程のために、過渡ラ

マン散乱光はそれら2波長光により限定されることとなり、試料の化学組成の正確な同定が可能となる。また、過渡ラマン散乱過程では、分子軸に対して特定の電場ベクトルをもつ光のみが強く感應するので、ポンプ光および一重項用プローブ光の偏光方向を決めて過渡ラマン散乱光を測定すれば、同じ分子でも配向方向の同定まで可能となる。

【0026】

[三重項過渡ラマン散乱光]

次に、この発明の二重共鳴吸収顕微鏡では、一重項状態の第一電子励起状態よりも低エネルギーである三重項準位を足場とした過渡ラマン散乱光をもその検出対象とすることができる。図8は、三重項過渡ラマン散乱光について説明する概念図である。

【0027】

波長 λ_1 のポンプ光で基底状態 S_0 の試料分子を S_1 状態へ励起させると、励起後の試料分子は、蛍光過程で基底状態に脱励起する一方で、多くの確率で図8に例示したように一重項第一電子励起状態 S_1 よりも低エネルギーである三重項準位 T_1 (=エネルギー E_{T1})にも遷移する。この三重項準位 T_1 は、基底状態 S_0 とは異なるスピン多重度を有しており、光学的な遷移が抑制される、いわゆるスピニ禁制となる。したがって、三重項準位 T_1 の寿命は極めて永く、多くの場合 μ 秒オーダーの寿命長をもつ。しかも、三重項準位 T_1 よりもエネルギー的に高位の三重項準位 T_2 (=エネルギー E_{T2})からの蛍光過程の確率は極めて低い。このことを利用し、ポンプ光の照射により基底状態 S_0 の試料分子を S_1 状態へ励起させて、蛍光発光過程の終了後(たとえば、試料分子によるが、数nsec経過後)、三重項準位 T_1 へ遷移した試料分子を、三重項準位 T_1 とより高位の三重項準位 T_2 (以下、励起三重項準位と呼ぶ)のエネルギー差($E_{T2}-E_{T1}$)に対応する波長 λ_3 の三重項用プローブ光の照射により励起三重項準位 T_2 へ励起させることで、励起三重項準位 T_2 の特定の振動準位から三重項準位 T_1 の高次振動準位 E_{Tf} へ遷移する波長 λ_5 (= $E_{T2}-E_{Tf}$ に対応する波長)の過渡ラマン散乱光が発生することなる。励起三重項準位 T_2 からは蛍光が出ないので、非常に高いS/Nで過渡ラマン散乱光を検出し、観測することができるのである。

【0028】

[過渡ラマン散乱光検出による平面分解能および三次元分解能]

上述した過渡ラマン散乱光（説明の簡略化のため一重項および三重項のものを総称する）は、波長 λ_1 のポンプ光と波長 λ_2 の一重項用プローブ光あるいは波長 λ_3 の三重項用プローブ光とが空間的に重なり合った観察試料の領域のみから発生する。たとえば図9に例示したように、ポンプ光とプローブ光（説明の簡略化のため一重項用および三重項用を総称する）を回折限界で集光した場合、実質上、両光が重ね合わされる照射領域は集光スポットの1領域に限定されるので、観察解像度は照射光の回折限界を上回ることが可能となる。図9は、試料面に集光したポンプ光とプローブ光のビームプロファイルの断面を例示したものであり、図中、 $0.61 \times \lambda_1 / NA$ および $0.61 \times \lambda_2 / NA$ は、レイリーリミットを規範とするポンプ光およびプローブ光の集光半径であり、回折限界に対応する。

【0029】

したがって、ポンプ光およびプローブ光を重合せ照射し、その重複領域を狭くすることで、二重共鳴吸収過程を利用した過渡ラマン散乱光の検出が、ビームの回折限界を上回る優れた平面分解能で可能となるのである。なお、このように過渡ラマン散乱光が発生する領域をラマン活性領域と呼ぶこととする。従来の蛍光を検出する二重共鳴吸収顕微鏡では、前述の図6に例示したように2波長光が重なり合っていない領域（蛍光領域 A_0 ）が蛍光発光領域であり観察領域であるが、この出願の発明の二重共鳴吸収顕微鏡では、ポンプ光およびプローブ光が重なり合った領域がラマン活性領域であり観察領域となる。

【0030】

さらに定量的に説明すると、過渡ラマン散乱光は、ポンプ光およびプローブ光によって限定されたラマン活性領域から発生するので、ラマン活性領域は光軸上に局在化することとなる。たとえば図10に例示したように、波長 λ_1 のポンプ光および波長 λ_2 のプローブ光（波長 λ_3 の場合も同じであるが、説明の簡略化のため波長 λ_2 で説明する）をハーフミラーで同軸に融合し、開口数NAの無収差レンズで試料面上に集光する。この場合、波動光学を用いた結像理論によれば、試料面上に集光されたポンプ光およびプローブ光のx-y焦表面上のエネルギー

強度プロファイルはそれぞれ、以下の数1および数2で与えられる。

【0031】

【数1】

$$I_{\lambda_1}(x, y) = \left[\frac{2E_{\lambda_1} J_1(2\pi\xi_1)}{2\pi\xi_1} \right]^2$$

$$\xi_1 = \frac{NA}{\lambda_1} \sqrt{x^2 + y^2}$$

【0032】

【数2】

$$I_{\lambda_2}(x, y) = \left[\frac{2E_{\lambda_2} J_1(2\pi\xi_2)}{2\pi\xi_2} \right]^2$$

$$\xi_2 = \frac{NA}{\lambda_2} \sqrt{x^2 + y^2}$$

【0033】

ここで、 $J_1(2\pi\xi_1)$ および $J_1(2\pi\xi_2)$ は1次のベッセル関数を示す。

また、 E_{λ_1} および E_{λ_2} はポンプ光およびプローブ光の電場強度を示す。

【0034】

一般に、ポンプ光の強度 $I_{\lambda_1}(x, y)$ が弱い場合には基底状態 S_0 から S_1 状態へ励起する分子の数 n_1 は $I_{\lambda_1}(x, y)$ に比例する。一方、過渡ラマン散乱光の強度もプローブ光の強度 $I_{\lambda_2}(x, y)$ に比例するので、結局、過渡ラマン散乱過程で発生する散乱光強度 $I_{\text{signal}}(x, y)$ は、ある比例定数 C を用いて、

【0035】

【数3】

$$I_{\text{signal}}(x, y) = C \left[\frac{\frac{J_1\left(2\pi \frac{NA}{\lambda_1} \sqrt{x^2 + y^2}\right)}{\sqrt{x^2 + y^2}}}{\frac{J_1\left(2\pi \frac{NA}{\lambda_2} \sqrt{x^2 + y^2}\right)}{\sqrt{x^2 + y^2}}} \right]^2$$

【0036】

と書ける。この数3から明らかなように、試料表面のラマン活性領域は、焦平面における同平面と光軸が交差する点からの距離を $r = (x^2 + y^2)^{1/2}$ として、分子が1次のベッセル関数の2乗に比例するとともに焦平面において r の4乗に反比例するという領域に限定される。従来公知の蛍光顕微鏡やラマン分光法では、信号光を発する領域は、数1のポンプ光の回折限界式で規定されるのであるが、それと比較すると数3は、明らかに信号光を発する領域が狭いので、回折限界を凌駕する平面分解能で試料を観察できることを示しており、過渡ラマン散乱光の検出の場合においても超解像性を実現することができる。

【0037】

図11は、上記の数1～3を用いて計算し、規格化したポンプ光強度 $I_{\lambda_1}(x, y)$ 、プローブ光強度 $I_{\lambda_1}(x, y)$ 、過渡ラマン散乱光強度 $I_{\text{signal}}(x, y)$ のプロファイルを例示したものであり、この図11からも、過渡ラマン散乱光強度 $I_{\text{signal}}(x, y)$ の光軸を中心としたプロファイルはポンプ光強度 $I_{\lambda_1}(x, y)$ およびプローブ光強度 $I_{\lambda_1}(x, y)$ よりも狭い範囲となっていることがわかり、過渡ラマン散乱過程による平面分解能の超解像性の実現が確認できる。

【0038】

さて、過渡ラマン散乱光を検出対象としたこの出願の発明の二重共鳴吸収顕微鏡では、光軸方向の分解能、すなわち三次元分解能の実現も可能となる。たとえば「0 puls E No.213 p107-116：鶴田国夫」からも明らかなように、数3で与

えられる光応答する領域の強度分布 $I_{\text{signal}}(x, y)$ のように、1次のベッセル関数の2乗に比例し且つ r の4乗に反比例する依存性が分子にある場合には、光軸方向にも光応答する領域が局在化するために、縦分解能すなわち三次元空間分解能を持つことになるのである。数3は、実は、検出光を受光する素子の前面にピンホールを設けた共焦点レーザー走査型顕微鏡の点像強度分布関数と同じ関数型をしているので（「0 puls E No.213 p107-116：鶴田国夫」参照）、試料内の光応答する領域が光軸方向にも局在化することを定量的に示している。

【0039】

ここで、基底状態 S_0 から S_1 状態へ励起する分子の数 n_1 はポンプ光の強度に比例し、過渡ラマン散乱光の強度もプローブ光の強度に比例すると仮定して、波動光学理論を用いると、以下のように光応答する領域を3次元的に計算できる。

【0040】

まず、開口数:NAの無収差レンズで波長 λ のレーザービームを集光すると、焦点近傍で、下記の数4で与えられる3次元電場分布関数 $f(x, y, z)$ をもつマイクロビームが形成される。

【0041】

【数4】

$$f(x, y, z) = \iint_{\text{NA}} e^{-\frac{z}{2f^2}(\xi^2 + \zeta^2)} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda}(x\xi + y\zeta)} d\xi d\zeta$$

【0042】

ここで、 (ξ, ζ) は瞳面の座標を示し、 f は焦点距離である。したがって、波長 λ_1 のポンプ光および波長 λ_2 のプローブ光の強度プロファイルはそれぞれ、以下の数5および数6で与えられる。

【0043】

【数5】

$$I_{\lambda_1}(x, y, z) = \left[\iint_{NA} e^{-\frac{z}{2f^2}(\xi^2 + \zeta^2)} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda_1}(x\xi + y\zeta\eta)} d\xi d\zeta \right]^2$$

【0044】

【数6】

$$I_{\lambda_2}(x, y, z) = \left[\iint_{NA} e^{-\frac{z}{2f^2}(\xi^2 + \zeta^2)} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda_2}(x\xi + y\zeta\eta)} d\xi d\zeta \right]^2$$

【0045】

基底状態 S_0 から S_1 状態へ励起する分子の数 n_1 はポンプの強度に比例し、ラマン散乱光の強度もプロープ光の強度に比例するということを利用すれば、過渡ラマン散乱過程で発生する3次元散乱光強度 $I_{signal}(x, y, z)$ は、ある比例定数 C を用いて、

【0046】

【数7】

$$I_{signal}(x, y, z) = C \left[\iint_{NA} e^{-\frac{z}{2f^2}(\xi^2 + \zeta^2)} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda_1}(x\xi + y\zeta\eta)} d\xi d\zeta \right]^2 \\ \cdot \left[\iint_{NA} e^{-\frac{z}{2f^2}(\xi^2 + \zeta^2)} e^{-i\frac{2\pi}{\lambda_2}(x\xi + y\zeta\eta)} d\xi d\zeta \right]^2$$

【0047】

と書ける。計算した $I_{signal}(x, y, z)$ を周波数空間にフーリエ変換すると、次式で与えられる実際に観察し得る物理量である3次元OTF : $S_{signal}(k)$

k_x, k_y, k_z) となる。

【0048】

【数8】

$$S_{\text{signal}}(k_x, k_y, k_z) = \iiint I_{\text{signal}}(x, y, z) e^{-(xk_x + yk_y + zk_z)} dx dy dz$$

【0049】

また、数5を同様にフーリエ変換すれば、次式で与えられる通常の蛍光顕微鏡に対する3次元OTF: $S_{\text{usual}}(k_x, k_y, k_z)$ が得られる。

【0050】

【数9】

$$S_{\text{usual}}(k_x, k_y, k_z) = \iiint I_{\lambda 1}(x, y, z) e^{-(xk_x + yk_y + zk_z)} dx dy dz$$

【0051】

ここで、 k_x, k_y, k_z は波長 λ_1 の励起光に対する波数ベクトル成分である。仮に、瞳面は光軸対称として、 $r = (x^2 + y^2)^{1/2}$ なるパラメータを導入し、数8および数9を用いて、通常の一光子励起過程の場合の(k_{1r}, k_{1z})および過渡ラマン散乱過程の場合の(k_{2r}, k_{2z})の空間分布断面を求めるとき、たとえば図12(a) (b)に示したようになる。図12(a) (b)は、各々、通常の一光子励起過程および過渡ラマン散乱過程の場合の分解能を例示したものであり、 k_{1r} および k_{2r} は、光軸からの動径方向に関するそれぞれの波数ベクトル成分である。

この図12(a) (b)によれば、通常の一光子励起過程の場合も、過渡ラマン散乱過程の場合も、動径方向の空間周波数帯域の上限 k_{\max} と下限 k_{\min} は、光学系の開口数NAを用いて、

【0052】

【数10】

$$K_{\max} = -K_{\min} = 2 \frac{NA}{\lambda_1}$$

【0053】

となり、横方向の空間分解能は同じである。しかし、光軸方向の分解能に関しては顕著な差が見いだせる。すなわち、通常の一光子励起過程では、原点を含む k_{1z} 軸方向には値を持たず、光軸方向には全く分解能を持たないのでに対し、過渡ラマン散乱過程では光軸方向 k_{2z} にも、

【0054】

【数11】

$$K_{\max} = -K_{\min} = \frac{\left(1 - (1 - NA^2)^{\frac{1}{2}}\right)}{\lambda_1}$$

【0055】

という値を持ち、いわゆる深さ方向の分解能をもつことがわかる。これは、物理学的に考察すると、数7が示すように過渡ラマン散乱過程による光活性領域が極めて狭い空間領域に局在することに対応している。したがって、この出願の発明の二重共鳴吸収顕微鏡では、過渡ラマン散乱過程を利用することで、優れた三次元空間分解能をも実現することができる。

【0056】

〔試料分析〕

さらにまた、この出願の発明では、ポンプ光とプローブ光の試料への照射を行う時間の間隔を変更させたり、両光の偏光状態、波長、または強度を互いに独立に変更させながら、過渡ラマン散乱光を測定することで、ポンプ光照射に起因する試料内の特定の分子の化学変化の時間的変化や構造変化などの試料についての詳細な情報を得ることができる。

【0057】

以上のように、この出願の発明の二重共鳴吸収顕微鏡は、二重共鳴吸収過程および過渡ラマン散乱過程を併用することで、横方向の平面分解能とともに光軸方向の深さ分解能を、照射光の回折限界を上回る超解像性で実現し、さらには詳細な試料分析をも可能なものとしている。

【0058】

以下に、添付した図面に沿って実施例を示し、この出願の発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。

【0059】

【実施例】

【実施例1】

図13は、この出願の発明の二重共鳴吸収顕微鏡の一実施例を示した概略図である。

【0060】

まず、基本光源としてはピコ秒Nd:YAGレーザー(1)が備えられており、その基本波をKDP結晶(2)で波長変換することで532nm、355nm、266nm等の高次高調波を発振させる。これらの光をさらにオプティカルパラメトリクジェネレーター(5)によって観察対象の試料分子をS₀→S₁励起可能な波長λ₁に変換し、これをポンプ光とする。

【0061】

また、ハーフミラー(3)により2倍高調波の1部を取り出し、ハーフミラー(4)を介して別のオプティカルパラメトリクジェネレーター(6)へ入射させ、試料分子をS₁→S₂励起可能な波長λ₂またはT₁→T₂励起可能な波長λ₃に変換し、これを一重項用プローブ光または三重項用プローブ光とする。これらプローブ光は、遅延光学系(7)により、パルスポンプ光と適当な時間差を得るために光学遅延される。時間差は、遅延光学系(7)に搭載されたプリズム(71)の平行移動で簡単に調節できる。具体的には、照射時間調整手段としての遅延光学系(7)の光路調整による光学遅延によって、波長λ₂の一重項用プローブ光は、ポンプ光の照射後、試料分子が一重項状態の第一電子励起状態S₁から三重項準位T₁へ遷移する前に試料面へ到達するように照射され、他方、波長λ₃の三重項

用プローブ光は、ポンプ光の照射後、試料分子が一重項状態の第一電子励起状態 S_1 から三重項準位 T_1 へ遷移した後に試料面へ到達するように照射される。

【0062】

このように照射時間調整されるプローブ光は、その光路上の偏光子（9）および揺動ミラー（10）を介してダイクロイックミラー（11）へ入射され、ポンプ光は、その光路上の偏光子（8）を介してダイクロイックミラー（11）へ入射される。両光は、ダイクロイックミラー（11）によって同一光路とされる。偏光状態可変手段としての偏光子（8）および（9）は、ポンプ光およびプローブ光の偏光面を自由に回転できる。

【0063】

さらに、本実施例では、重ね手段としての振動ミラー（10）によって、プローブ光の光路をポンプ光に対して調整することで、前述の図9に例示したように集光面上で互いの照射領域を一部分重ね合わせることができる。もちろん両光の照射領域の全部分を重ね合わせるようにしてもよいが、前述したように平面分解能をより優れたものとするには、一部分のみを重ね合わせ、且つその重合せ領域を狭くする方が望ましい。

【0064】

このように照射領域および照射時間が調整されるポンプ光およびプローブ光は、リレーレンズ（12）により成形されて、ハーフミラー（13）へ入射され、対物レンズ（14）を通り試料（15）上へ集光される。試料（15）は試料走査ステージ（16）上に設置されている。

【0065】

上述のようにポンプ光の照射後に、一重項用プローブ光が照射された場合には一重項過渡ラマン散乱光が試料（15）から発生し、三重項用プローブ光が照射された場合には三重項過渡ラマン散乱光が試料（15）から発生する。

【0066】

これら過渡ラマン散乱光は、ハーフミラー（13）を通過し、ハーフミラー（17）で反射されて、検出光学系に入射される。本実施例における検出光学系は、偏光子（18）、レンズ（19）、ピンホール（20）、レンズ（21）、透

過型回折光子（22）、およびICCDカメラ（23）で構成されている。この場合、過渡ラマン散乱光は、偏光子（18）を介してレンズ（19）によってピンホール（20）の中央に集光され、さらにレンズ（21）によって透過型回折格子（22）を介して光電子変換原理を用いた高感度のICCDカメラ（23）へ入射される。ピンホール（20）は空間フィルターとして機能し、試料（15）以外から発する、たとえば光学系からの蛍光等をカットして測定のS/N比をより高めることができる。また、透過型回折光子（22）はスペクトルメーターとして機能するので、過渡ラマン散乱光の測定はもちろんのこと、ラマンスペクトルやレーザー照射に対する時間応答をも測定できるので、試料（15）の化学構造や組成の解析が可能となる。さらにまた、偏光子（8）（9）によってポンプ光およびプローブ光の偏光面を相対的に変化させることで、試料（15）の組成の空間配向情報も得られる。

【0067】

このように図13に例示した二重共鳴吸収顕微鏡は、過渡ラマン散乱光の測定によって極めて優れた平面分解能および三次元分解能を有する、高機能分析型の超解像顕微鏡を実現している。

【0068】

図14は、図13の二重共鳴吸収顕微鏡を制御する電気系の一例を示した概略ブロック図である。二重共鳴吸収顕微鏡を含む顕微鏡システムの全系は基本的にコンピュータ（101）によって制御される。

【0069】

まず、コンピュータ（101）は、Nd:YAGレーザー（1）の発振および試料（15）の試料走査ステージ（16）の駆動制御を行う。系のタイミングは全てコンピュータ（101）のクロックに準拠しており、このクロックを分周器（102）により、レーザー発振可能な周波数まで分周する。さらに、この分周されたクロック信号をゲート&ディレイジェネレータ（103）により遅延および波形整形してレーザー制御用のQスイッチ信号とし、Nd:YAGレーザー（1）を制御する。

【0070】

レーザーショットごとの過渡ラマン散乱光は、ICCDカメラ（23）のCCDアレー（104）でモニターされる。より具体的には、レーザーショットにより試料（15）から発光した過渡ラマン散乱光は、透過型回折格子（22）で分光された後、CCDアレー（104）によりラマンスペクトルとして検出される。CCDアレー（104）の各画素の蓄積データは、試料走査ステージ（16）の移動およびレーザー発光と同期しながら、レーザーショットごとにコンピュータ（10）のメモリーに転送される。そして、コンピュータ（101）の数値演算処理により、コンピュータ（101）のメモリー（図示していない）に記憶されたラマンスペクトルデータから、特定のラマン散乱光の波長のデータだけが抽出されて、試料（15）の二次元走査画像が形成される。

【0071】

このようにして測定された各波長に対する二次元走査画像を画像解析することで、単なる過渡ラマン散乱光による像を得ることに止まらず、ラマンスペクトルも計測できるのでより多角的に試料（15）の二次元組成分析が可能となる。二次元走査画像データや解析データなどは、記憶手段（図示していない）に記憶されたり、ディスプレイ（105）やプリンター（106）などの外部出力手段に出力される。

【0072】

〔実施例2〕

ここでは、一重項過渡ラマン散乱光および三重項過渡ラマン散乱光が良好に観測できる分子の例を紹介する。

【0073】

たとえば、ベンゼン環が3個直列につながったパラーテトラフェニールでは、波長300 nmを中心に $S_0 \rightarrow S_1$ の吸収帯域が存在し、500 nm前後に $S_1 \rightarrow S_2$ の過渡吸収帯域が広がる。そのC-H基をはじめとする過渡ラマン散乱スペクトルは500 nmより長波長側に展開する。

【0074】

また、5-ジベンゾスベレンの各誘導体は、 $S_0 \rightarrow S_1$ の吸収帯域が波長280 nm前後にあり、600 nm前後に $S_1 \rightarrow S_2$ の過渡吸収帯域が広がる。この分子は

、数10%以上の高い収量で最低三重項準位 T_1 に移行する。そして、420 nm近くに最低三重項準位 T_1 からより高位の三重項準位への過渡吸収帯が存在する。この、過渡吸収帯に関しては、吸収後に全く蛍光を発しないないので、非常に優れたS/Nで過渡ラマン散乱光を検出できる。しかも、 S_1 状態から最低三重項準位 T_1 へ移行する時間は数μsecもの時間があり、ポンプ光とプローブの時間間隔が大きくとれるので、ラマン散乱光とポンプ光の分離がし易く、S/Nをさらに高めることができる。

【0075】

同様のことが、生物学的に興味深いフラビンヌクレオチド内の各フラビン蛋白分子にも当てはまり、C=C、C=O、CH2-、CHOH-、CN-等の化学基を分別することができる。

【0076】

この発明の二重共鳴吸収顕微鏡では、励起される試料分子がカオチンであることが、過渡ラマン散乱光の高精度測定などの見地から好ましい。

【0077】

もちろん、この発明は以上の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

【0078】

【発明の効果】

以上詳しく述べた通り、この出願の発明は、照射光の回折限界を上回る超解像性で平面分解能とともに三次元分解能を実現し、さらには詳細な試料分析も可能なものとする、全く新しい二重共鳴吸収顕微鏡を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

基底状態の試料分子の電子配置を例示した図である。

【図2】

S_1 状態に励起された試料分子の電子配置を例示した図である。

【図3】

S_2 状態に励起された試料分子の電子配置を例示した図である。

【図4】

脱励起した試料分子の電子配置を例示した図である。

【図5】

二重共鳴吸収過程を例示した概念図である。

【図6】

二重共鳴吸収過程を空間的に例示した概念図である。

【図7】

一重項過渡ラマン散乱光について説明する概念図である。

【図8】

三重項過渡ラマン散乱光について説明する概念図である。

【図9】

ポンプ光およびプローブ光の照射領域の重合せを例示した概念図である。

【図10】

ポンプ光およびプローブ光の照射光学系を例示した概略図である。

【図11】

ポンプ光、プローブ光、過渡ラマン散乱光の強度プロファイルの一例を示した図である。

【図12】

図12 (a) (b) は、各々、通常の一光子励起過程および過渡ラマン散乱過程の場合の分解能を例示したものである。

【図13】

この出願の発明の二重共鳴吸収顕微鏡の一実施例を示した概略図である。

【図14】

図13の二重共鳴吸収顕微鏡を制御する電気系の一例を示した概略ブロック図である。

【符号の説明】

1 Nd : YAG レーザー

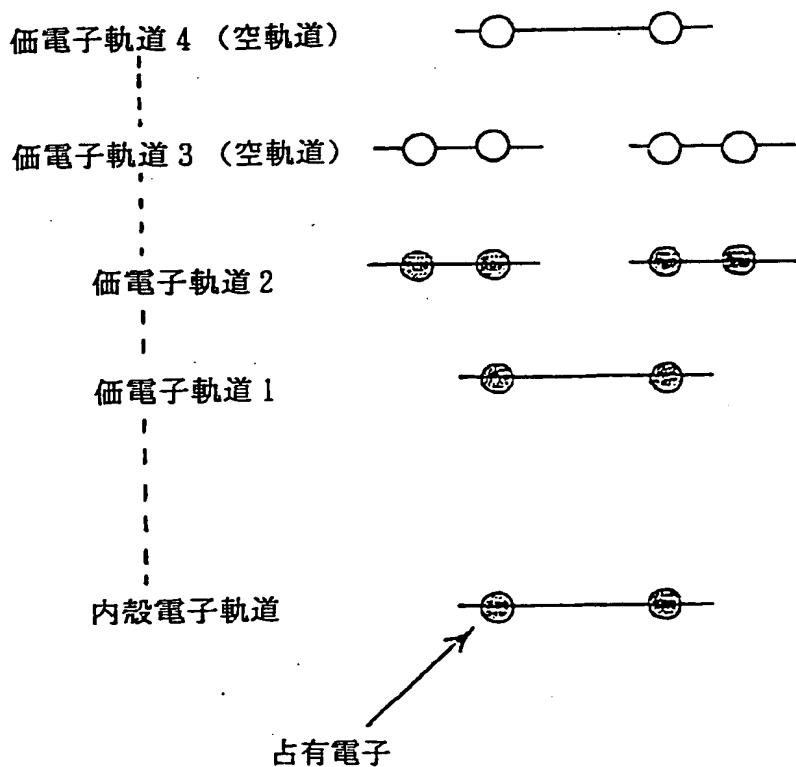
2 KDP 結晶

3, 4 ハーフミラー

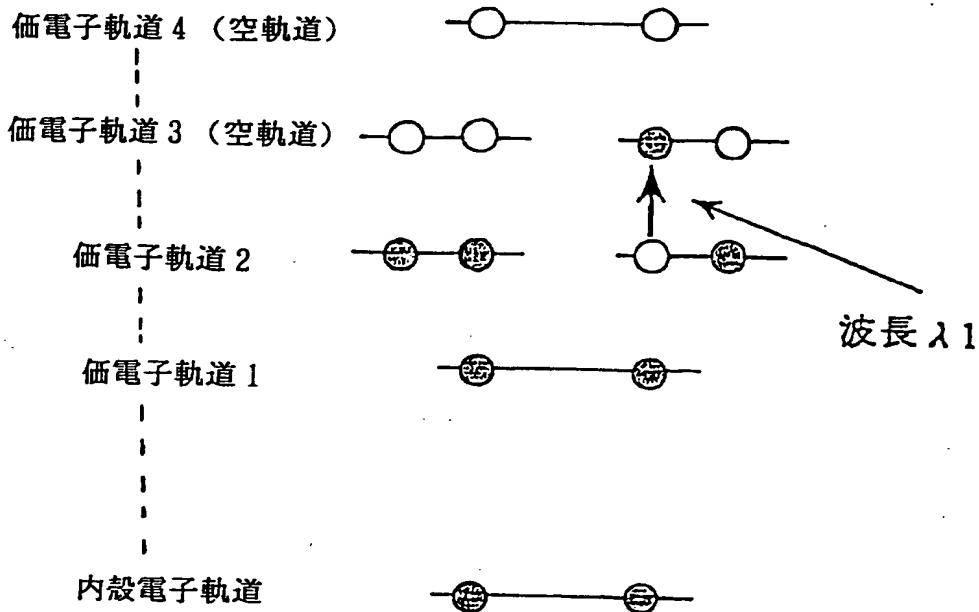
- 5, 6 オプティカルパラメトリックジェネレーター
- 7 遅延光学系
- 7 1 プリズム
- 8, 9 偏光子
- 1 0 搖動ミラー
- 1 1 ダイクロイックミラー
- 1 2 リレーレンズ
- 1 3 ハーフミラー
- 1 4 対物レンズ
- 1 5 試料
- 1 6 試料走査ステージ
- 1 7 反射ミラー
- 1 8 偏光子
- 1 9, 2 1 レンズ
- 2 0 ピンホール
- 2 2 透過型回折光子
- 2 3 I C C D カメラ
- 1 0 1 コンピュータ
- 1 0 2 分周器
- 1 0 3 ゲート&ディレイジェネレータ
- 1 0 4 C C D アレー
- 1 0 5 ディスプレイ
- 1 0 6 プリンター

【書類名】 図面

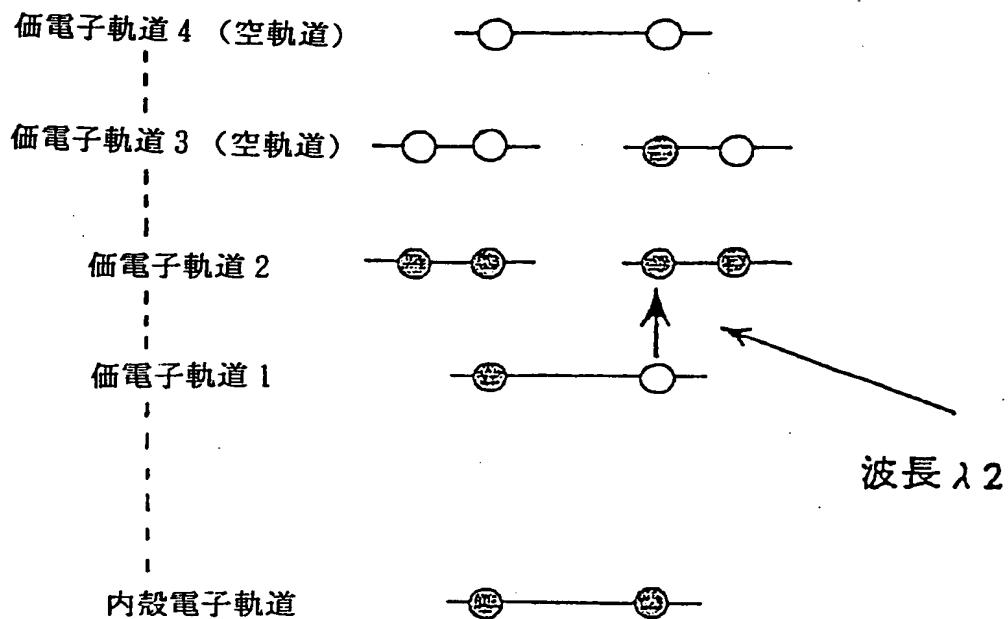
【図1】



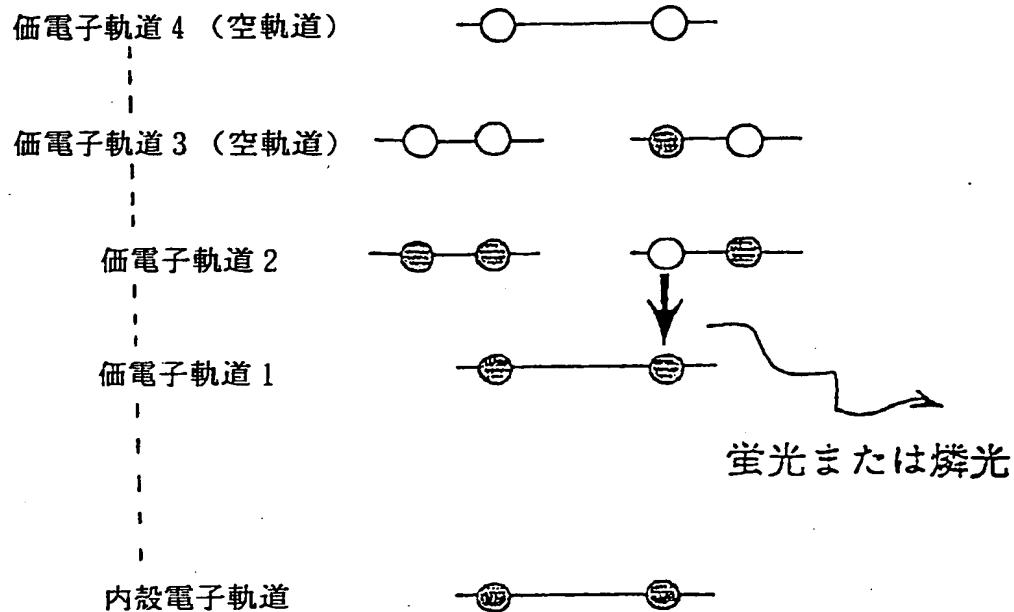
【図2】



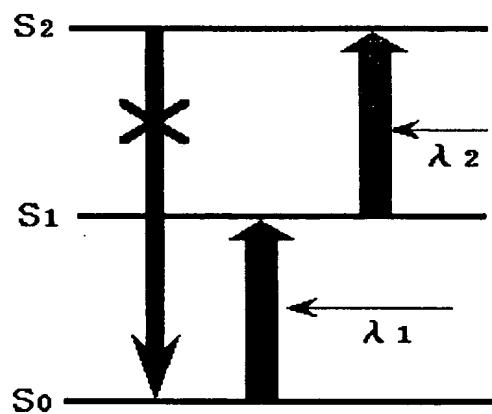
【図3】



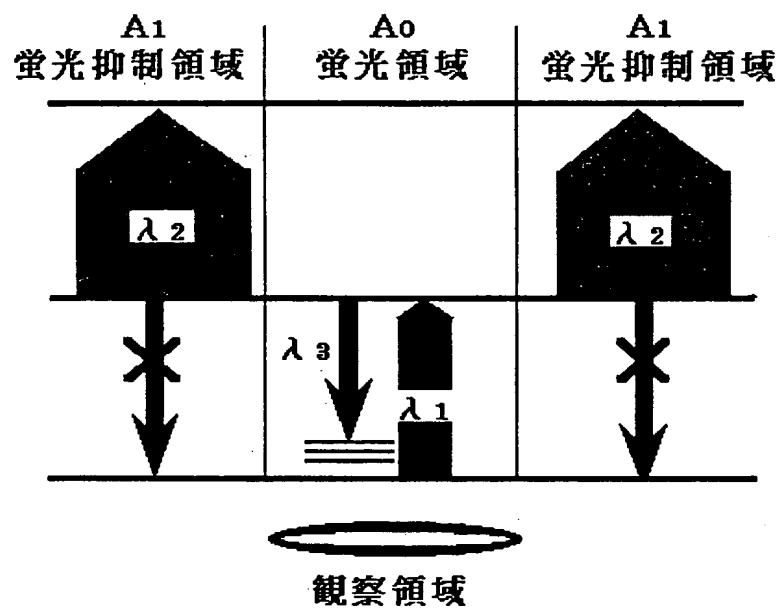
【図4】



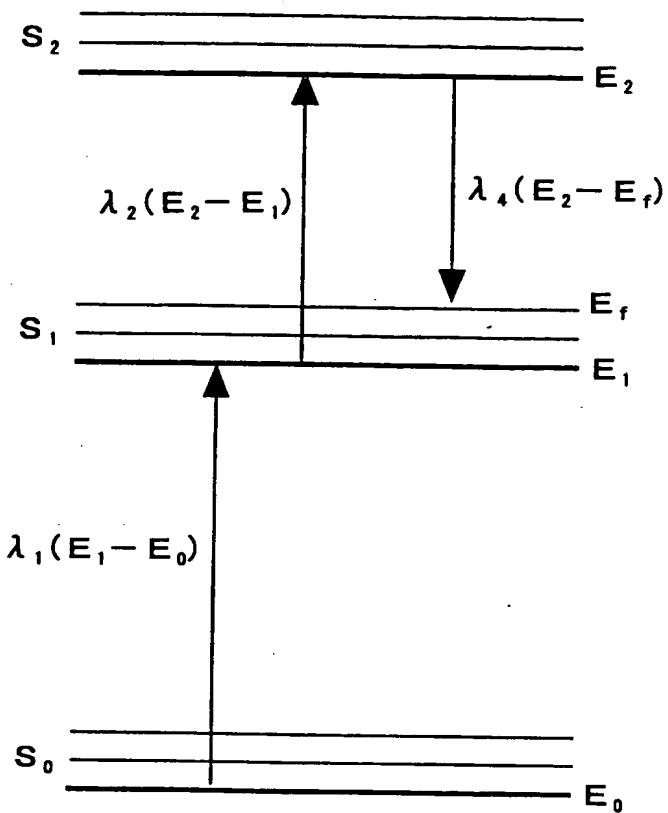
【図5】



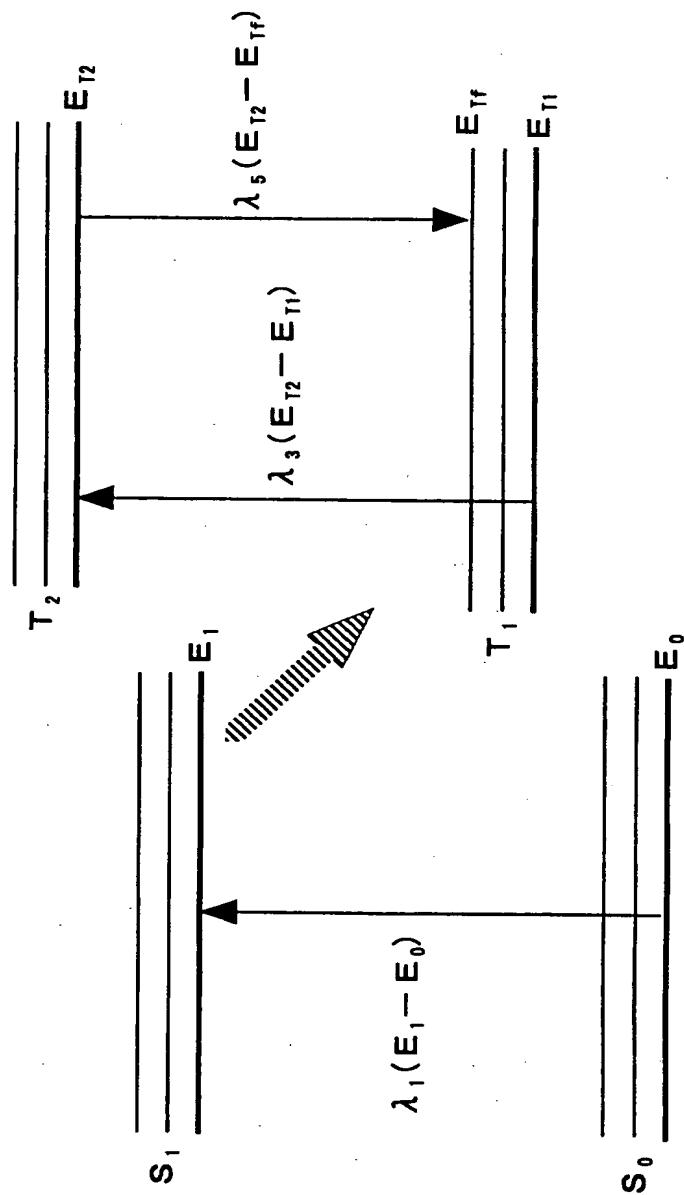
【図6】



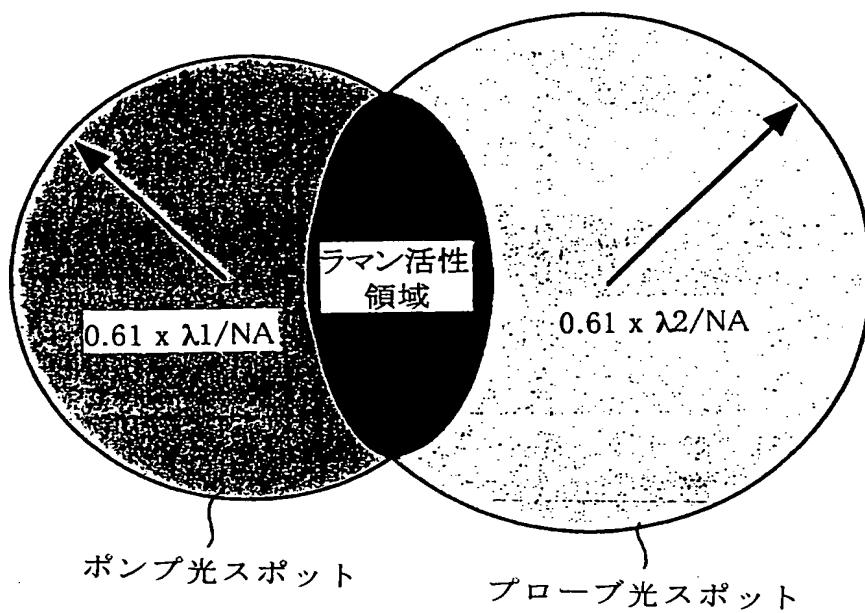
【図7】



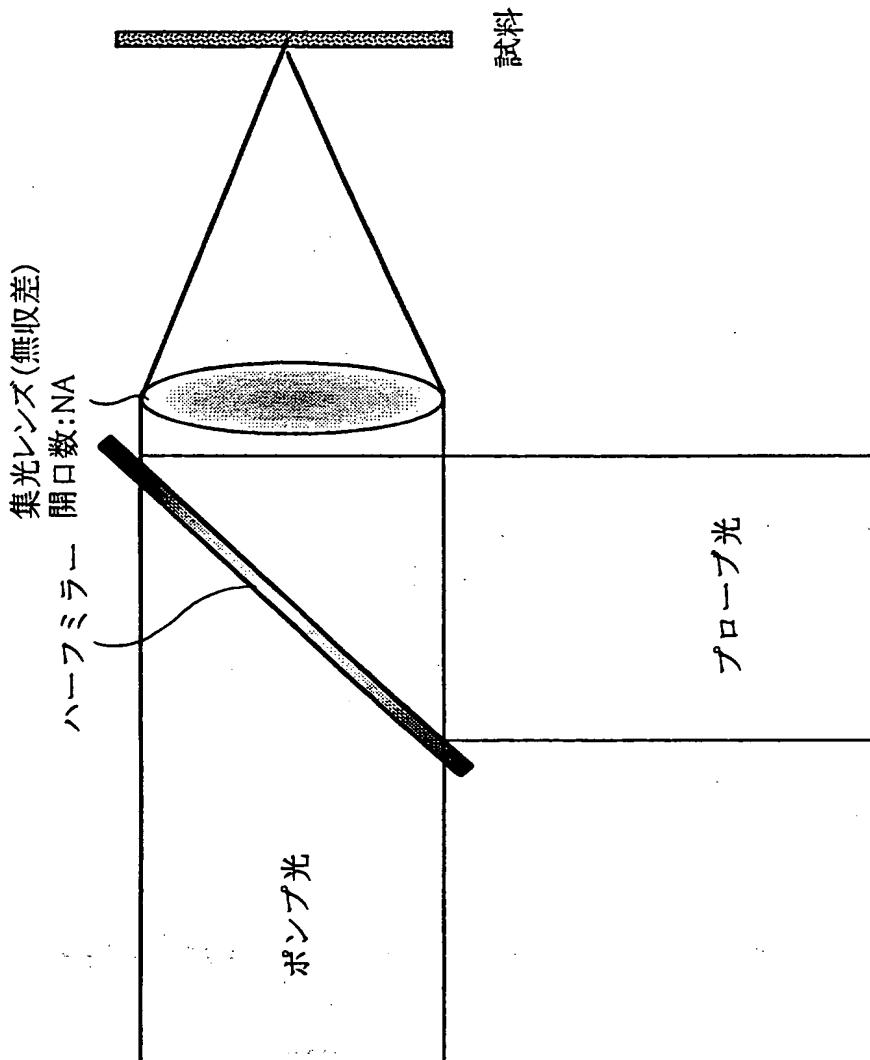
【図8】



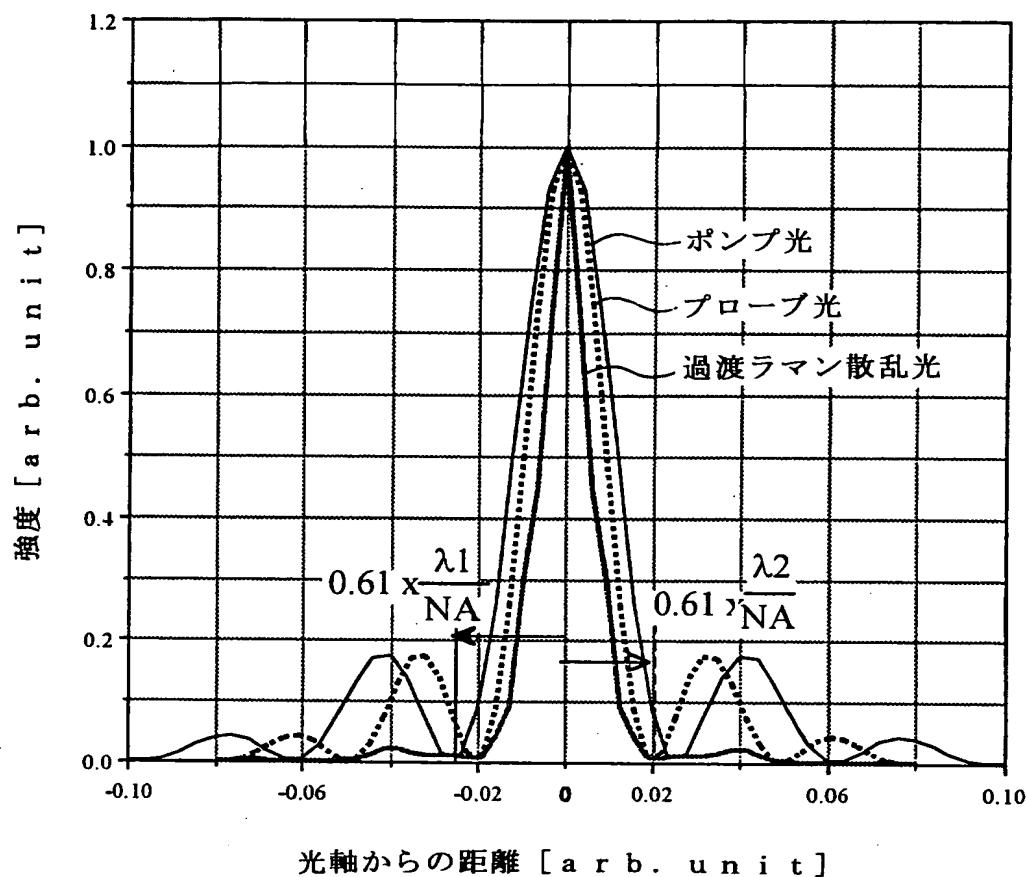
【図9】



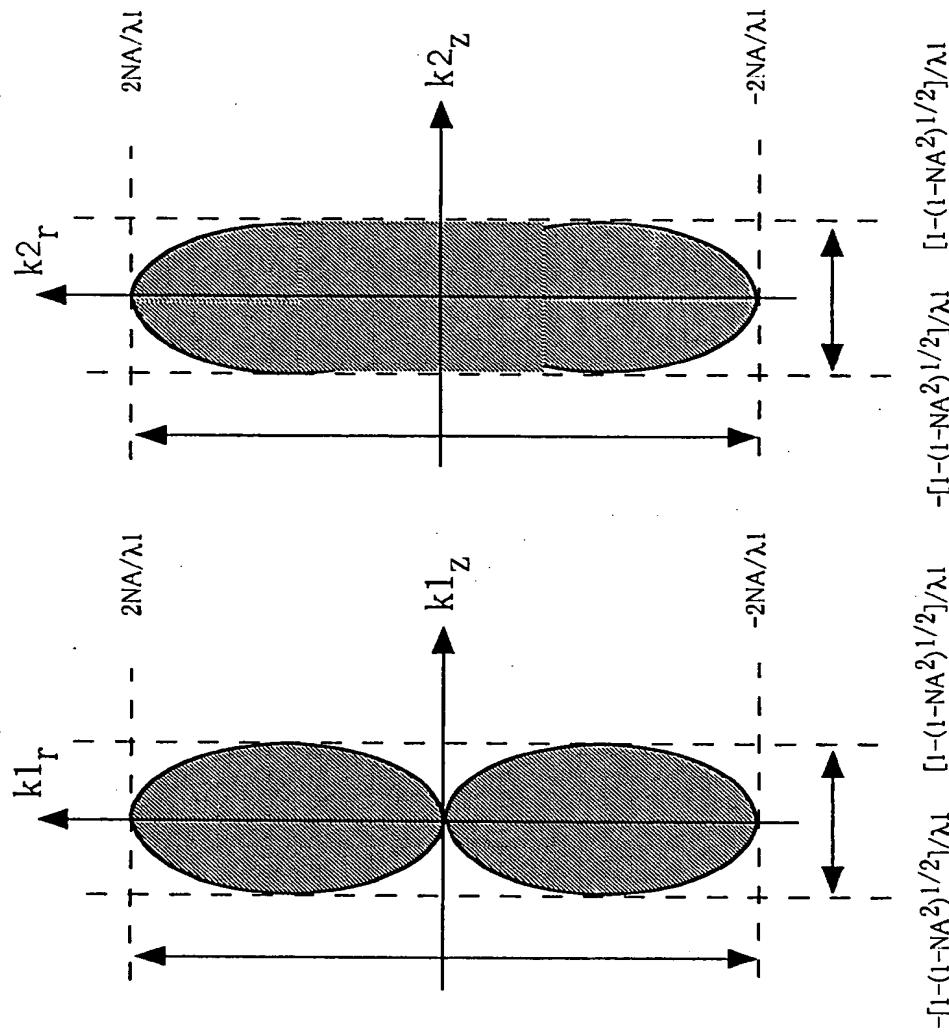
【図10】



【図11】

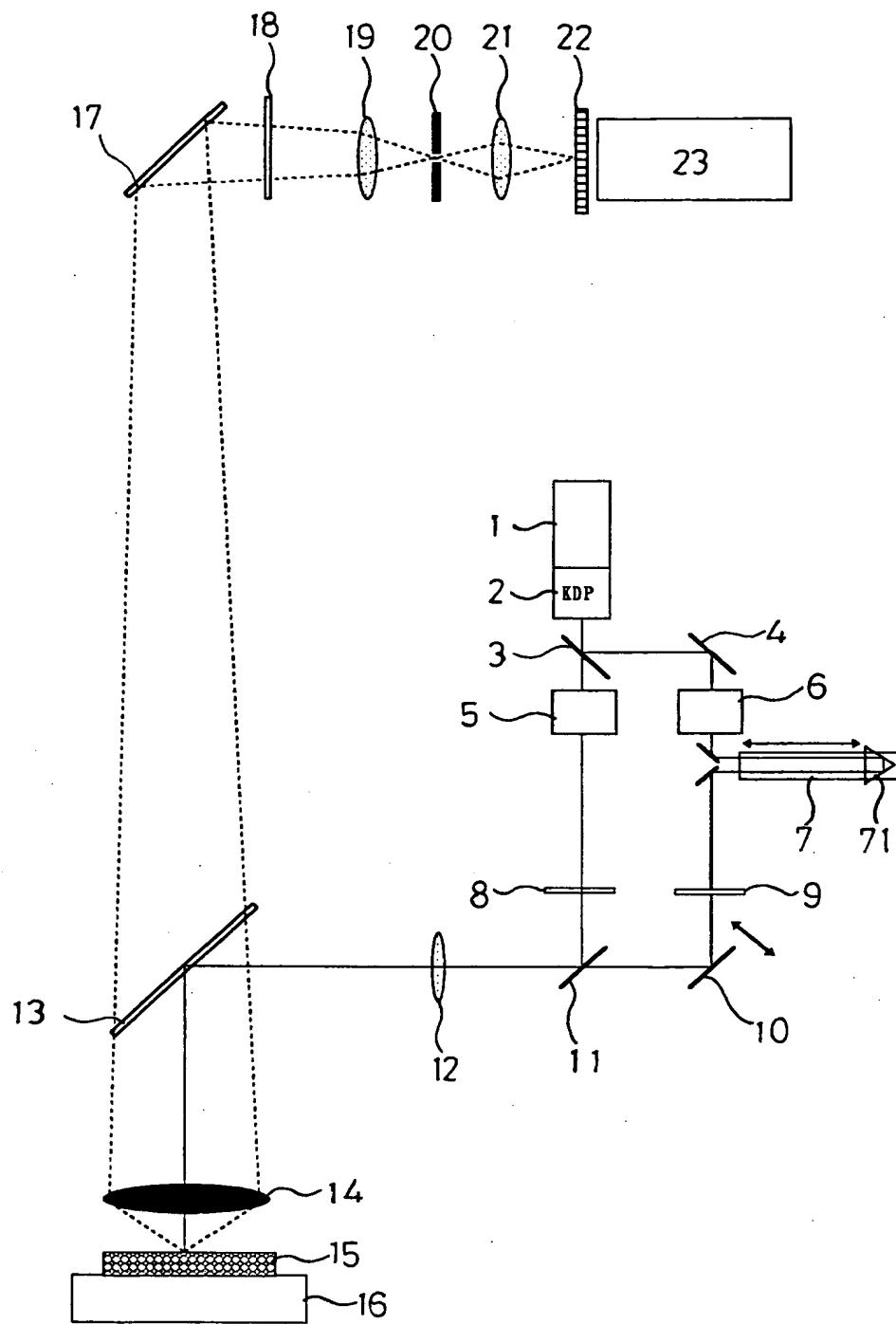


【図12】

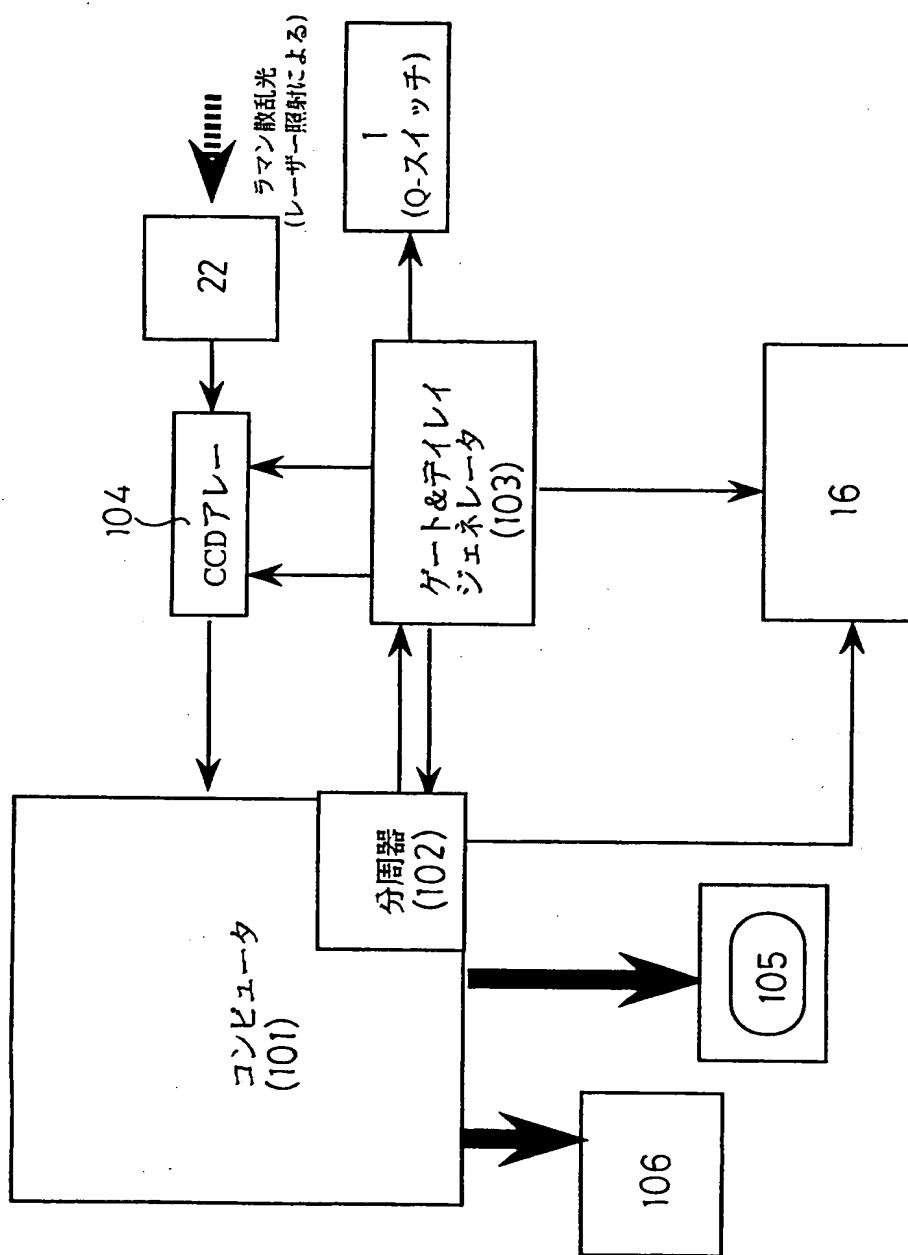


(a) 通常の1光子励起過程 (b) 過渡ラマン過程

【図13】



【図14】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 優れた三次元空間分解能を有する、全く新しい二重共鳴吸収顕微鏡を提供する。

【解決手段】 試料分子を基底状態から一重項状態の第一電子励起状態へ励起させる波長 λ_1 のポンプ光の光源と、第一電子励起状態の試料分子を一重項状態の第二電子励起状態またはより高い励起状態へ励起させる波長 λ_2 のプローブ光の光源と、ポンプ光およびプローブ光の照射領域を一部分もしくは全部分重ね合わせる重ね手段とを有しており、重ね手段を介してポンプ光およびプローブ光を試料に照射し、試料内のポンプ光およびプローブ光が重なり合った領域から発生する過渡ラマン散乱光を検出する。

【選択図】 図9

特2000-082930

【書類名】 手続補正書

【提出日】 平成12年 4月19日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2000- 82930

【補正をする者】

【識別番号】 000000376

【氏名又は名称】 オリンパス光学工業株式会社

【補正をする者】

【識別番号】 500130036

【氏名又は名称】 株式会社日本ローパー

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 提出物件の目録

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 委任状 2

(B)20000780075

委任状

平成12年3月14日

私は、

識別番号100093230(弁理士)西澤利夫氏

を以て代理人として下記事項を委任します。

特許2000-082930

1. 特許出願(発明の名称:ニセウム吸収顕微鏡)
登録番号:NP994P3-KT
1. 上記出願又は平成 年 月 日 第 号に基づく
特許法第41条第1項又は実用新案法第8条第1項の規定による優先権の主張
及びその取下げ

1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求
1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続(権利維持の管理については除く)並びにこれらの権利の放棄
1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標(防護標章)登録に対する登録異議の申立てに関する手続
1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、防護標章登録又は商標(防護標章)更新登録に対する無効審判の請求に関する手続
1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求
1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続
1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ
1. 上記各項に關し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住 所 東京都渋谷区渋谷2丁目43番2号
オリンパス光学工業株式会社
名 称 代表取締役社長 岸本正壽

代 表 者



委任状

平成12年3月23日

私は、

識別番号100093230(弁理士)西澤利夫氏
を以て代理人として下記事項を委任します。

1. 特願2000-082930特許出願 に関する手続
 1. 上記出願又は平成 年 月 日 第 号に基づく
 特許法第41条第1項又は実用新案法第8条第1項の規定による優先権の主張
 及びその取下げ
 1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
 1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
 1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求
 1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に
 基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続（権利維持の管理について
 は除く）並びにこれらの権利の放棄
 1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護標章）登録
 に対する登録異議の申立てに関する手続
 1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、
 防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関する
 手続
 1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求
 1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続
 1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ
 1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
 1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住 所

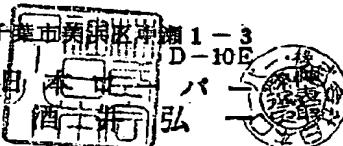
名 称

代 表 者

〒231-8501 千葉市美浜区中瀬1-3

株式会社 日本 パー

代表取締役 潤一郎 弘



認定・付加情報

特許出願の番号 特願2000-082930
受付番号 20000780075
書類名 手続補正書
担当官 大畠 智昭 7392
作成日 平成12年 6月 2日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

次頁無

【書類名】 手続補正書
【提出日】 平成12年 7月 4日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2000- 82930
【補正をする者】
【識別番号】 396020800
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
【代理人】
【識別番号】 100093230
【弁理士】
【氏名又は名称】 西澤 利夫
【手続補正 1】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 提出物件の目録
【補正方法】 追加
【補正の内容】
【提出物件の目録】
【物件名】 代理権を証明する書面 1

(B)20001290078



【整理番号】

委任状

平成12年4月19日

私儀 識別番号100093230 弁理士 西澤利夫氏

を代理人として次の事項を委任します。

1、 特願2000-082890 特願2000-082898 特願2000-118633
 特願2000-082893 特願2000-082930 の
 特許出願に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変
 更及び拒絶査定に対する審判の請求並びにその取下げ。

2、 上記出願に基づく特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の優先
 権主張並びにその取下げ及び優先権主張に伴う後の出願に関する一切の件。

3、 上記出願の分割出願に関する上記事項一切。

4、 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の
 提出、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の下附を受ける事項。

5、 第1項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ等に対
 する答弁、取下げその他本件に関する提出書類及び物件の下附を受ける事項。

6、 上記出願に係る特許権に関する一切の手続。ただし、特許権の維持に係る年
 金納付に関する手続を除く。

7、 上記各項に關し行政不服審査法に基づく諸手続に関する事項。

8、 上記事項を処理するため、復代理人を選任及び解任する事項。

識別番号 396020800

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

科学技術振興事業団

理事長 川崎雅弘



認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-082930
受付番号	20001290078
書類名	手続補正書
担当官	大畠 智昭 7392
作成日	平成12年 8月14日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

次頁無

出願人履歴情報

識別番号 [000000376]

1. 変更年月日 1990年 8月20日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

氏 名 オリンパス光学工業株式会社

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団

出願人履歴情報

識別番号 [500130036]

1. 変更年月日 2000年 3月23日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県千葉市美浜区中瀬1-3

氏 名 株式会社日本ローパー